

ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Σχεδιασμός Συσκευής για Καλλιέργεια Κυττάρων Μέσα σε Μήτρες Από Κολλαγόνο

Ονοματεπώνυμο: Πρέζα Ιωάννα

A.E.M: 02109711

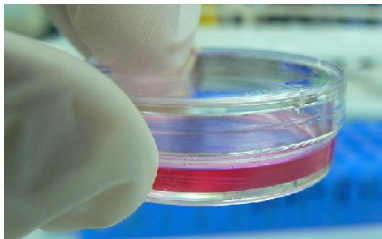
Υπεύθυνος καθηγητής: Αλεξόπουλος Λεωνίδας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κίνητρο:

Το βασικό κίνητρο για τη δημιουργία της κατασκευής είναι να υπάρχει ένα σύστημα για να μελετάμε τη μετάδοση σήματος σε κύτταρα που αλληλεπιδρούν με 3D μήτρες, με τρόπο που να επιτρέπει αυτοματοποίηση πειραμάτων.

Με τον όρο μετάδοση σήματος (signal transduction) εννοούμε τη διαδικασία κατά την οποία ένα εξωτερικό σήμα ενεργοποιεί κάποιες ειδικές πρωτεΐνες (receptors) στην επιφάνεια του κυττάρου και στη συνέχεια το μήνυμα μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου δημιουργώντας μια βιολογική ανταπόκριση.



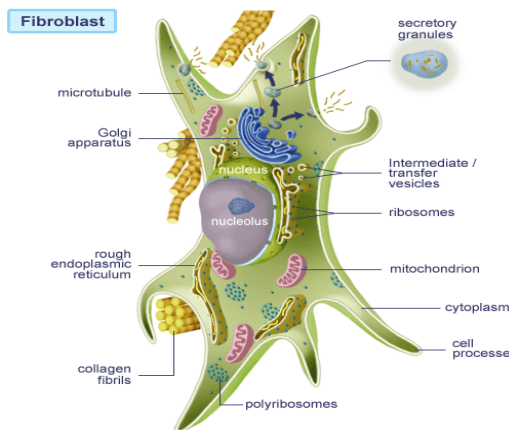
Εικόνα1. 2d
καλλιέργεια
σε petri dish

Η παρουσία 3-διάστατης μήτρας αποτελεί ένα πιο ρεαλιστικό μοντέλο κυττάρων καθώς ανταποκρίνεται περισσότερο στο φυσικό τους περιβάλλον και έτσι έχουμε περισσότερα αξιόπιστα αποτελέσματα. Η εισαγωγή αυτοματοποίησης από την άλλη επιτρέπει τη διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων, μέσω των οποίων μπορούμε ταυτοποιήσουμε διάφορες ενεργές ουσίες σε ένα βιολογικό μονοπάτι και γενικότερα η μέθοδος αυτή βοηθά στο να αντλήσουμε περισσότερα δεδομένα. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα από τα θετικά χαρακτηριστικά της τρισδιάστατης καλλιέργειας.

Η καλλιέργεια κυττάρων είναι μία διαδικασία όπου τα κύτταρα μεγαλώνουν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος. Για την καλλιέργεια σε 2-διαστατο περιβάλλον χρησιμοποιούνται ειδικά πλαστικά «πιάτα» γνωστά ως petri dish, εργαστηριακές φλάσκες κ.α. Με αυτό τον τρόπο η καλλιέργεια είναι εύκολο να δημιουργηθεί και να διατηρηθεί και παρέχει καλή βιωσιμότητα των κυττάρων. Γι αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα για την καλλιέργεια ενός ή πολλών ειδών κυττάρων δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Εκτός από αυτή τη μέθοδο, καλλιέργεια κυττάρων γίνεται και μέσα σε βιολογικά προερχόμενες μήτρες (3d culture). Αυτές οι μήτρες αποτελούν ένα πιο ρεαλιστικό μοντέλο του φυσικού περιβάλλοντος των κυττάρων και έτσι οι αλληλεπιδράσεις και οι συμπεριφορές των κυττάρων είναι όμοιες με την

πραγματική τους συμπεριφορά. Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα εκφράζουν διαφορετικό φαινότυπο (differentiation, migration, proliferation, morphology etc) το οποίο δεν εκφράζεται σε συμβατά σκληρά υποστρώματα. Επίσης με αυτή τη μέθοδο εξασφαλίζονται περισσότερο ελεγχόμενες συνθήκες και υπάρχει η δυνατότητα να διαχειρισμού της ροής δημιουργώντας κατάλληλες γεωμετρίες και διατάξεις.

ΜΟΝΤΕΛΟ



Εικόνα2.
Βασική δομή
κυττάρου
ινοβλάστη

Για μια πρώτη εφαρμογή του προτύπου επιλέγουμε καλλιέργεια **ινοβλαστών** σε πορώδεις **μήτρες κολλαγόνου**.

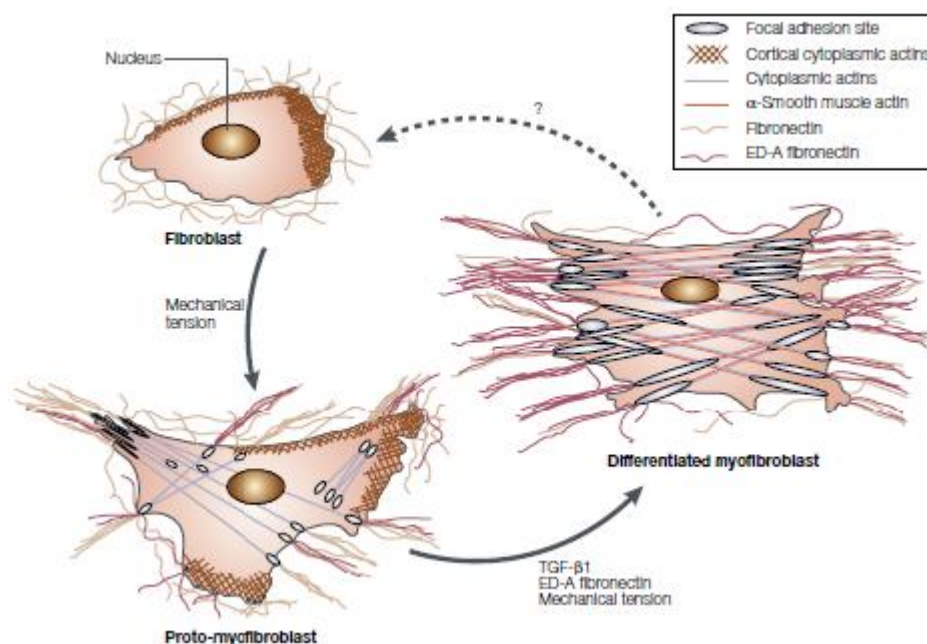
ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ

Οι ινοβλάστες αποτελούν κυτταρικό τύπο που συναντάται σε όλα τα είδη συνδετικού ιστού. Ο συνδετικός ιστός είναι ένας από τις τέσσερις κατηγορίες βιολογικών ιστών (epithelial, muscular, nervous tissues) που υποστηρίζουν, συνδέουν ή διαχωρίζουν διαφορούς τύπους ιστών και οργάνων του σώματος. Βασική λειτουργία των ινοβλαστών είναι να διατηρήσουν τη δομική ακεραιότητα του συνδετικού ιστού, μέσω δημιουργίας διαφόρων πρωτεϊνών όπως κολλαγόνο, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες κ.α. που βρίσκονται στην εξωκυτταρική μήτρα. Οι ινοβλάστες μελετώνται λοιπόν λόγω της ιδιότητάς τους να συνθέτουν και να αναδιαμορφώνουν την εξωκυτταρική μήτρα (ECM) και να δημιουργούν ή να καταστρέφουν κολλαγόνο.

Οι ινοβλάστες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην παθολογία. Η παρουσία τους είναι πολύ σημαντική στην επούλωση πληγών. Η επούλωση πληγής στο δέρμα περιλαμβάνει το στάδιο της εκ νέου επιθηλίωσης (re-epithelialization), που περιλαμβάνει την μετακίνηση των επιδερμικών κυττάρων για την ανασύσταση του ιστού και δεύτερον το στάδιο της δημιουργίας και συστολής του κοκκιώδη ιστού (granulation tissue). Ο ρόλος των ινοβλαστών είναι ότι μετακινούνται μέσα στην περιοχή της πληγής, αφήνοντας κολλαγόνο και άλλες ουσίες (fibronectin), δημιουργώντας δυνάμεις τριβής οι οποίες τείνουν να παραλληλίσουν το κολλαγόνο και τους ινοβλάστες κατά μήκος της πληγής. Έτσι οι

ινοβλάστες αλλάζουν μορφή και λέγονται proto- myofibroblasts και στη συνέχεια με την επίδραση μηχανικής έντασης και κάποιων παραγόντων (growth factors), αλλάζουν μορφή και λέγονται differentiated myofibroblasts τα οποία δημιουργούν μεγαλύτερες συστατικές δυνάμεις από ότι τα προηγούμενα, συμβάλλοντας έτσι στο κλείσιμο της πληγής.

Μία ειδική κατηγορία ινοβλαστών αποτελούν τα cancer associated fibroblasts (CAFs), τα οποία συμβάλουν στον πολλαπλασιασμό, στην εισβολή του καρκίνου και βοηθούν στην διατήρηση της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων μέσω πολλαπλών αυξητικών παραγόντων (growth factors) και σηματοδοτικών μονοπατιών (signalling pathways).



- Εικόνα3. Ενεργοποίηση του proto-μυοφιβροblast φαινοτύπου από τους ινοβλαστούς μέσω μηχανικής έντασης(αριστερά), το proto-μυοφιβροblast διαφοροποιείται σε differentiated μυοφιβροblast μέσω μηχανικής έντασης και growth factors (δεξιά). ([Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling](#) James J. Tomasek, Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier & Robert A. Brown).

ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

Το κολλαγόνο είναι βασική δομική πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού, η οποία συνθέτει το 25% της συνολικής πρωτεΐνης στα θηλαστικά. Δέσμες κολλαγόνου γνωστές ως collagen fibrils αποτελούν βασικό συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας, που υποστηρίζουν τους περισσότερους ιστούς και δίνουν δομή στα κύτταρα εξωτερικά αλλά το κολλαγόνο μπορεί να βρεθεί και στο εσωτερικό κάποιων κυττάρων. Έχει μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό, καθώς

είναι το βασικό συστατικό των χόνδρων, συνδέσμων, τενόντων, οστών και του δέρματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι κολλαγόνου. Ο τύπος που χρησιμοποιούμε λέγεται collagen type I. Ο λόγος που χρησιμοποιούμε πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου είναι πως αποτελεί βασικό συστατικό του περιβάλλοντος των κυττάρων. Όπως είπαμε και παραπάνω μέσα σε αυτό το περιβάλλον το κολλαγόνο έχει τη μορφή ινών που αποκτούν 3-διάστατη δομή και έτσι δημιουργείται κάτι σαν πορώδες μέσα στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα. Παρακάτω περιγράφουμε συνοπτικά πως κατασκευάζεται εργαστηριακά αυτό το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου που θα χρησιμοποιηθεί και για τα πειράματα της κατασκευής.

Η κατασκευή ενός πορώδους ικρίωματος από κολλαγόνο αποτελείται από τέσσερα στάδια:

- Ετοιμάζεται το διάλυμα, το οποίο αποτελείται από ίνες κολλαγόνου και άλλα συστατικά τα οποία διαλύονται μέσα σε οξικό οξύ.
- Το διάλυμα αυτό τοποθετείται μέσα σε ένα καλούπι, όπου μέσα σ αυτή το ικρίωμα παίρνει το τελικό επιθυμητό σχήμα. Μετά αυτό παγώνει με αποτέλεσμα να δημιουργούνται κρύσταλλοι πάγου (freezing step) οι οποίοι αφαιρούνται με εξάχνωση εφαρμόζοντας υψηλή πίεση (drying step). Το τελικό αποτέλεσμα περιλαμβάνει ένα πορώδες υλικό που αποτελείται από το κολλαγόνο που είχε παγιδευτεί στους κρυστάλλους μετά το πάγωμα και από πόρους που αντιστοιχούν στους κρυστάλλους πάγου που αφαιρέθηκαν.
- Το 3^ο στάδιο είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει τη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ διαφορετικών μορίων μέσα στο ικρίωμα (cross-linking). Αυτό γίνεται δημιουργώντας υψηλή πίεση σε αυξανόμενη θερμοκρασία (όχι πάνω από 150° C). Αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η αύξηση της μηχανικής σκληρότητας του ικρίωματος και αύξηση της αντοχής του σε υποβάθμιση (από ένζυμα που εκκρίνονται από τα κύτταρα).
- Το αποτέλεσμα της προηγούμενης διαδικασίας του freeze-drying είναι ένα στεγνό φύλλο ικρίωματος. Στα εργαστηριακά όμως πειράματα χρειάζονται πολύ μικρότερα δείγματα ικρίωματος κολλαγόνου. Αυτά τα δείγματα κόβονται από το αρχικό φύλλο με ειδικά εργαλεία όπως φαίνονται στο σχήμα.

Χρήσεις: (collagen type I)

- Οστικά μοσχεύματα
- Αναγέννηση ιστού (έχει τις σωστές ιδιότητες για tissue regeneration όπως πορώδη δομή, διαπερατότητα, υδροφιλικότητα και είναι σταθερό in vivo)
- Χειρουργικές επεμβάσεις για τη δημιουργία τεχνικών υποκατάστατων δέρματος σε περιπτώσεις σοβαρών εγκαυμάτων
- Βοηθά στην επούλωση πληγών

- Ικρίωματα κολλαγόνου (collagen scaffolds) είναι ιδανικά για εναπόθεση κυττάρων όπως osteoblasts & fibroblasts και μόλις εισαχθούν μπορούν να αναπτυχθούν όπως αναπτύσσονται φυσιολογικά στον ιστό. (in vivo)

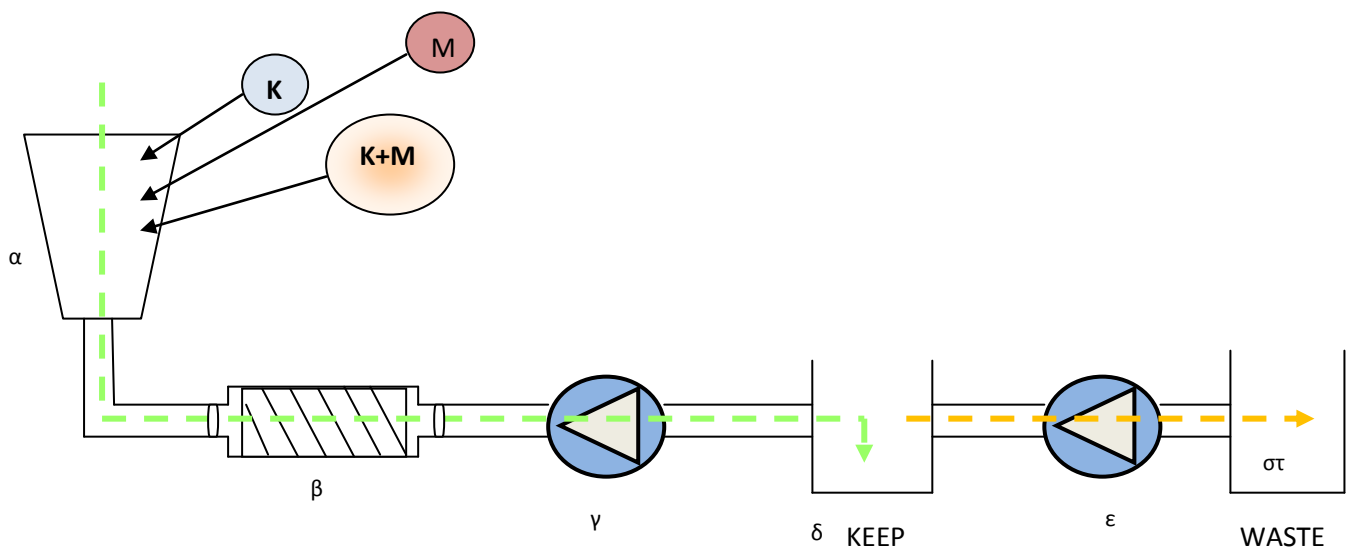


Εικόνα4. Το φύλλο πορώδους κολλαγόνου κόβεται σε κυλίνδρους με biopsy punch για εργαστηριακά πειράματα (αριστερά). Φύλλο πορώδους ικρίωματος κολλαγόνου (δεξιά).

ΔΙΑΤΑΞΗ- ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

Σε αυτή την εργασία σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε μία συσκευή στην οποία μπορούμε να βάζουμε κύτταρα μέσα σε ένα πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου και σε επόμενο στάδιο να μπορούμε από αυτή να αλλάζουμε διαλύματα αυτόματα.

Παρακάτω δίνεται μια εποπτική εικόνα του συνόλου της κατασκευής (ποιοτικά).



Εικόνα5: α) Δοχείο στο οποίο θα μπαίνουν διάφορα διαλύματα β) Μήτρα στην οποία θα τοποθετείται το κολλαγόνο και θα συγκρατείται γ), δ) διάταξη η οποία θα ρουφά διάλυμα και θα το κρατάει εάν είναι επιθυμητό ε), στ) διάταξη η οποία θα ρουφά διάλυμα και θα το στέλνει σε δοχείο για να απορριφθεί

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ

- Η δεξαμενή να μπορεί να τροφοδοτείται με διάλυμα από 100 μ l- 3 ml μέγιστο
- Να μπορούμε να καθορίσουμε την ποσότητα του διαλύματος χειροκίνητα ή αυτόματα
- Το ικρίωμα κολλαγόνου να βρίσκεται σε θάλαμο κλειστής μορφής και να μπορεί να διασφαλιστεί στεγανότητα του θαλάμου
- Θα πρέπει να υπάρχει δυνατότητα πρόσβασης στο θάλαμο για την αλλαγή του ικρίωματος κολλαγόνου, τον καθαρισμό και την αποστείρωση του θαλάμου
- Εάν το ικρίωμα δεν συγκρατείται με κάποιο τρόπο μέσα στο θάλαμο τότε όταν συρρικνωθεί η ροή δεν θα περνά διαμέσο αυτού αλλά θα το παρακάμπτει
- Το ικρίωμα κολλαγόνου είναι κυλινδρικής μορφής με $\Phi = 5\text{mm}$ και ύψος $h = 3\text{mm}$
- Η παροχή του ρευστού μέσα στη μήτρα θα κυμαίνεται από 1 μ l/sec- 10 μ l/sec
- Να μπορεί να απορροφηθεί το διάλυμα μέσα από το ικρίωμα ώστε να μπορούμε να αλλάζουμε διαλύματα όποτε χρειάζεται
- Να μπορώ να κρατώ το διάλυμα σ ένα ξεχωριστό δοχείο όταν το χρειάζομαι για το πείραμα και για περαιτέρω επεξεργασία ενώ όταν δεν το χρειάζομαι να πηγαίνει κάπου όπου και θα πετιέται (waste)
- Η παραπάνω διαδικασία να γίνεται αυτόματα έτσι ώστε ο πειραματιστής να παρεμβαίνει μόνο για να πάρει την επιθυμητή ποσότητα διαλύματος που χρειάζεται ή να πετάει το waste όταν έχει γεμίσει

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ

Σε αυτή την παράγραφο παραθέτουμε ορισμένες σύγχρονες μεθόδους κατασκευής και υλικά που βρίσκουν χρήση σήμερα σε μικροσυστήματα βιολογικών διεργασιών.

ΜΕΘΟΔΟΙ

- Photolithography (UV light)
- Softlithography
- Injection molding
- Laser micromachining

Soft lithography- photolithography:

Μέθοδοι που φτάνουν σε πολύ μεγάλες ακρίβειες, με κρίσιμες διαστάσεις μέχρι και 0.1μm όμως οι διαστάσεις που χρειαζόμαστε (3-4mm) είναι μεγάλες για αυτή τη μέθοδο. Επίσης αποτελεί περισσότερο πολύπλοκη και ακριβή διαδικασία. Υλικά που χρησιμοποιούνται είναι το πυρίτιο, γυαλί, pdms και άλλα πολυμερή (polyethylene, polyurethane etc).

Laser micromachining

Η ακρίβεια που μπορούμε να πετύχουμε είναι της τάξης των nm με έλεγχο μόνο από τον υπολογιστή και κατάλληλες ρυθμίσεις όπου το laser χαράσει το υλικό και του δίνει την επιθυμητή μορφή. Η μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα καθώς είναι αρκετά αξιόπιστη, γρήγορη και φθηνή. Με αυτή τη μέθοδο, με την ενχύραξη της επιφάνειας του υλικού δεν επηρεάζονται τα υπόλοιπα υποστρώματα δηλαδή δεν παραμορφώνονται όπως θα συνέβαινε σε μία κατεργασία. Όμως ομοίως με την προηγούμενη μέθοδο το laser δεν μπορεί να χαράξει σε τόσο μεγάλο βάθος. Επίσης τα υπολείμματα άνθρακα που μένουν στην επιφάνεια του υλικού από την ενχύραξη δεν πρέπει να έρθουν σε επαφή με το κολλαγόνο καθώς θα μολύνουν τα κύτταρα. Υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι κάποια μέταλλα, κεραμικά, πολυμερή.

Υλικά

PDMS:

Η περισσότερη έρευνα σε microfluidic systems γίνεται με χρήση PDMS (polydimethylsiloxane) και άλλων πολυμερών. Κατασκευή με πολυμερή είναι πιο εύκολη, πιο φθηνή και πιο ευέλικτη από ότι το πυρίτιο ή το γυαλί. Επίσης αποφεύγονται προβλήματα των σκληρών υλικών (όπως αιχμηρά θραύσματα κατά το σπάσιμο). Το PDMS είναι ένα οπτικά διαφανές ελαστομερές του οποίου η δυσκαμψία μπορεί να ελεγχθεί από ένα πολύ μαλακό σε ένα πιο σκληρό υλικό. Έχει μέτρο ελαστικότητας γύρω στα 750 kPa, ανασχηματίζεται εύκολα, συμμορφώνεται στις επιφάνειες και αποκολλάται από ένα καλούπι χωρίς να καταστρέφει το υλικό του ούτε αυτό του καλουπιού.

Ακόμη είναι πιο εύκολο να σφραγίσουμε τα κανάλια του PDMS από ότι αυτά που είναι κατασκευασμένα από πυρίτιο, σιλικόνη ή άλλα θερμοπλαστικά καθώς απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Η διαδικασία μπορεί να γίνει σε εργαστηριακές συνθήκες εκθέτοντας την επιφάνεια του PDMS σε πλάσμα αερίου ή οξυγόνου. Τότε το PDMS μπορεί να σφραγισθεί με PDMS, πυρίτιο, πολυστυρένιο, νιτρίδιο του πυριτίου, πολυαιθυλένιο, plexiglass.

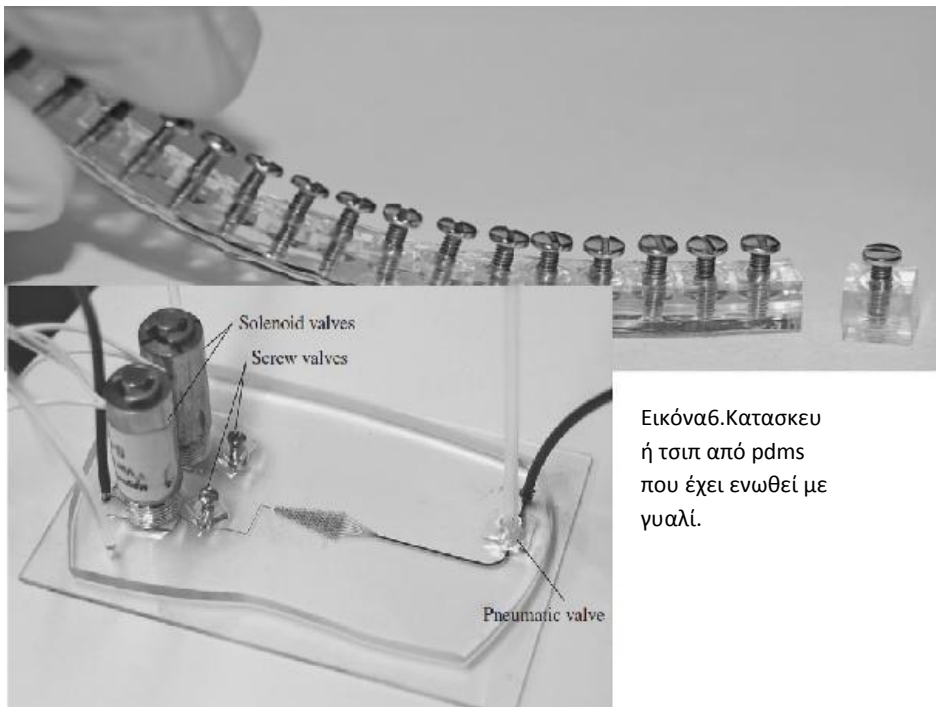
Το PDMS είναι μη τοξικό σε πρωτεΐνες και κύτταρα, είναι συμβατό με το νερό και στους περισσότερους πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη και γλυκερόλη, αλλά λιώνει στους μη πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο.

Άλλα πολυμερή που χρησιμοποιούνται για κατασκευή μικροσυσκευών είναι:

- h- PDMS
- photocurable perfluoropolyethers (PFPE)
- Cyclic olefin copolymer (a thermoplastic polymer)
- Thermoset polyester
- Polymethylmethacrylate
- Polycarbonate
- Polyurethanes

Κάθε υλικό έχει τα δικά του πλεονεκτήματα- μειονεκτήματα και εξαρτάται από το είδος της εφαρμογής ποιο από αυτά είναι το κατάλληλότερο.

Για παράδειγμα τα PFPEs μία κατηγορία φθοροπολυμερών, που είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου είναι χημικώς ανθεκτικά (όπως το τεφλόν). Είναι συμβατά με οργανικούς διαλύτες, όπως το διχλωρομεθάνιο που λιώνει το PDMS. Ωστόσο η διαδικασία κατασκευής είναι περισσότερο πολύπλοκη από αυτή του PDMS και είναι πολύ πιο ακριβά.



Εικόνα6.Κατασκευ
ή τσιπ από pdms
που έχει ενωθεί με
γυαλί.

PLEXIGLASS (PMMA):

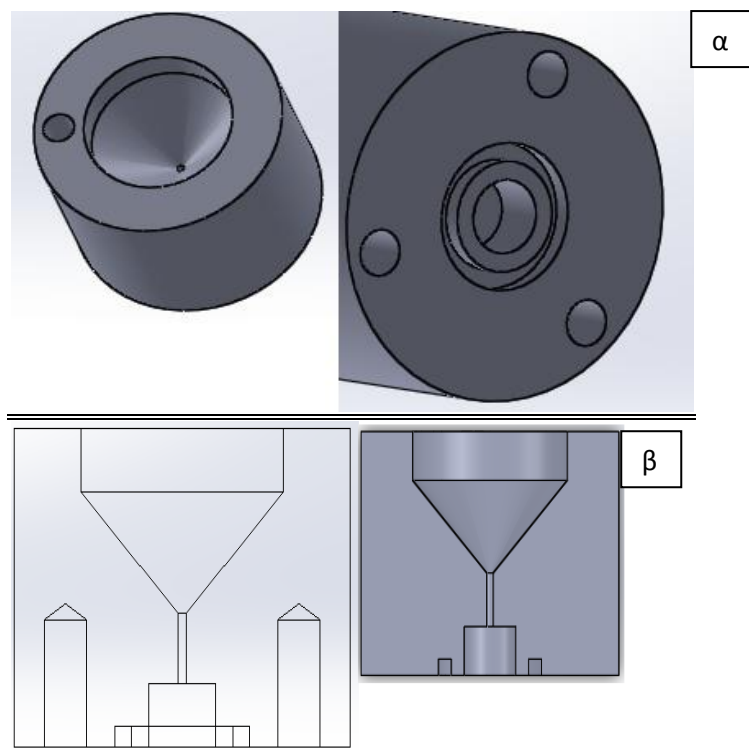
Το plexiglass είναι ένα διαφανές θερμοπλαστικό και προτιμάται πολλές φορές στις κατασκευές όπου δεν απαιτούνται μεγάλες δυνάμεις καθώς είναι διαχειρίσιμο και φθινό. Εμφανίζει ψαθυρή συμπεριφορά όταν φορτίζεται, κυρίως σε κρουστικές δυνάμεις και είναι επιρεπές όταν χαράσσεται σε σχέση με το οργανικό γυαλί. Ακόμη μειονέκτημα μπορεί να θεωρηθεί η ευαισθησία του σε υψηλές θερμοκρασίες (λιώνει στους 160° C) με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να το αποστειρώσουμε σε φούρνο. Το PMMA λιώνει και διαλύεται σε

πολλά οργανικά διαλύματα και έχει χαμηλή αντίσταση σε άλλα χημικά. Παρ' όλα αυτά είναι πιο σταθερό σε σχέση με άλλα πλαστικά (polystyrene, polyethylene).

Σχεδιασμός Συσκευής Καλλιέργειας

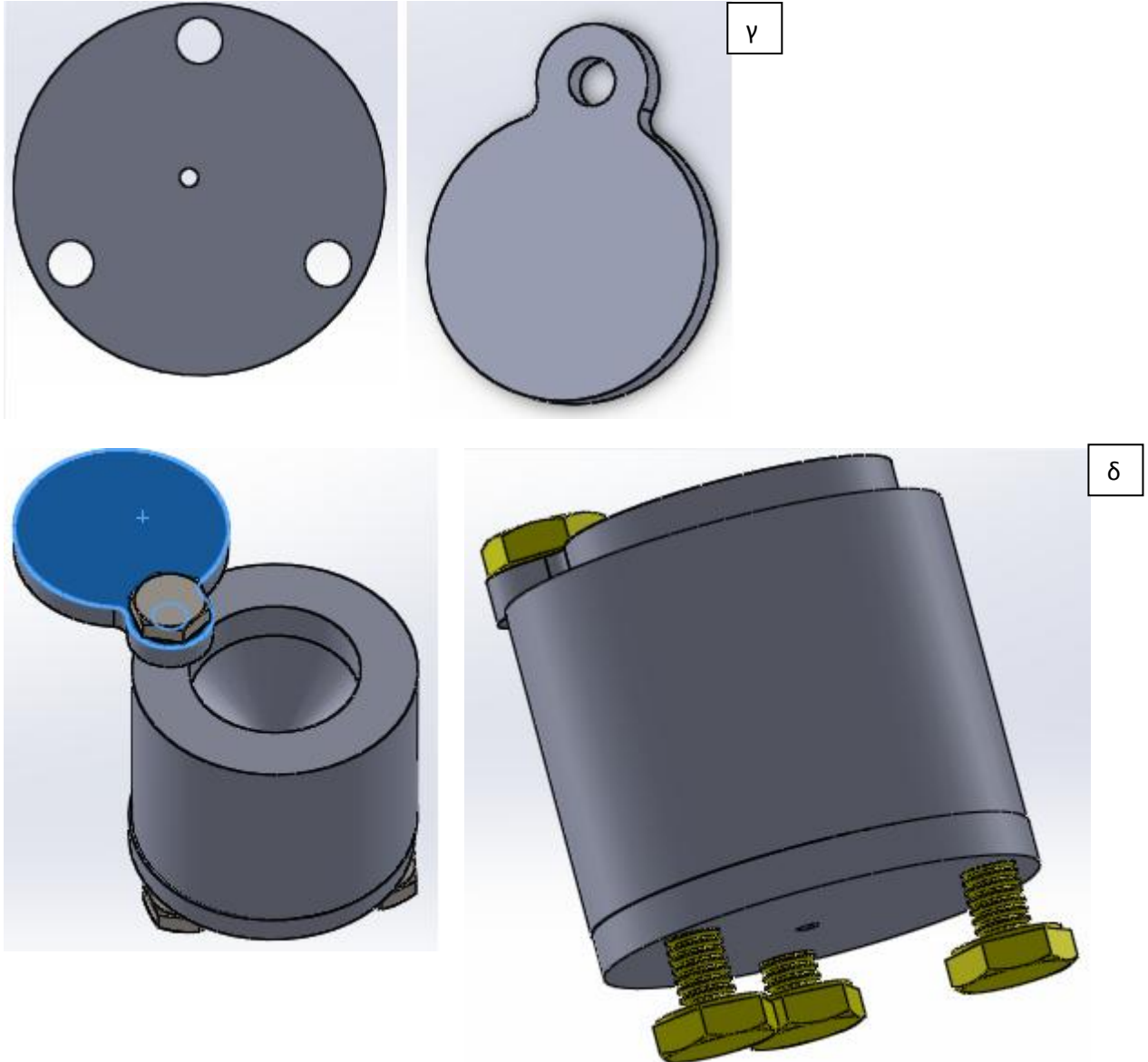
Επιλέχθηκε plexiglass για μία πρώτη κατασκευή της συσκευής καθώς είναι φθηνό εύκολο να το βρούμε και να κατεργαστεί με καλή ακρίβεια σε συμβατικές μηχανές κατεργασίας. Αυτό που μένει να απαντηθεί είναι εάν το υλικό είναι βιωσιμικό για την καλλιέργεια κυττάρων και δεν θα επηρεάσει την ανταπόκρισή τους. Γι' αυτό το λόγο ήδη βρίσκεται σε εξέλιξη ένα πείραμα στο εργαστήριο όπου έχουμε τοποθετήσει plexiglass μέσα σε πλάκες Multiwell μαζί με ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρων (huh7- καρκινικές ηπατικές κυτταροσειρές) για να καταλάβουμε κατά πόσο τα επηρεάζει το υλικό.

Χρησιμοποιήθηκε ράβδος plexiglass διαμέτρου $\Phi = 20 \text{ mm}$ η οποία κατεργάσθηκε στον τόρνο και τη φρέζα και απέκτησε την επιθυμητή μορφή της μήτρας. Τα υπόλοιπα δύο κομμάτια της συναρμογής κόπηκαν στο laser καθώς είχαν μικρό πάχος και δεν θα έρχονταν σε επαφή με το ικρίωμα κολλαγόνου. Τα κομμάτια συνδέθηκαν με κοχλίες με σπείρωμα. Παρακάτω παρουσιάζουμε την δομή της συσκευής σε τρισδιάστατα μοντέλα. Τα αντίστοιχα κατασκευαστικά σχέδια παραθέτονται στο παράρτημα.



Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε το βασικό σώμα της συσκευής ολόκληρο και σε τομή. Στην πάνω μεριά το δοχείο κωνικής διατομής για την τοποθέτηση των διαλυμάτων. Η

κωνική μορφή προτιμήθηκε έτσι ώστε να εισέρχεται όλο το διάλυμα μέσα στη διατομή και να μην παραμένει στο δοχείο (πάνω αριστερά). Στο κάτω μέρος κατασκευάστηκε το καλούπι κυκλικής διατομής ώστε να σφηνώνεται μέσα το ικρίωμα κολλαγόνου και έγινε κατάλληλη διαμόρφωση για την τοποθέτηση στεγανωτικού δακτυλίου.



Εικόνα7. α) 3-διάστατη απεικόνιση της μήτρας β) 3-διάστατη απεικόνιση της μήτρας σε τομή γ) κάτω καπάκι με το οποίο σφραγίζει η μήτρα (αριστερά), άνω καπάκι με το οποίο κλείνει το δοχείο πίεσης (δεξιά) δ) 3-διάστατη απεικόνιση του συναρμολογήματος.

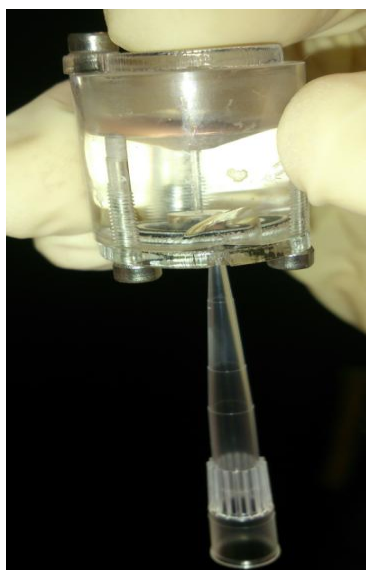
Στις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε τα δύο εξαρτήματα που κόπηκαν στο laser. Το καπάκι με τις τρεις οπές είναι αυτό που κοχλιώνεται στην κάτω βάση του κυλίνδρου στεγανώνοντας το καλούπι. Το δεύτερο είναι το καπάκι για το δοχείο με το διάλυμα. Στις επόμενες εικόνες παρατηρούμε την τελική μορφή τις συναρμογής.

ΑΝΤΙΚΤΥΠΟΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ – ΠΙΘΑΝΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

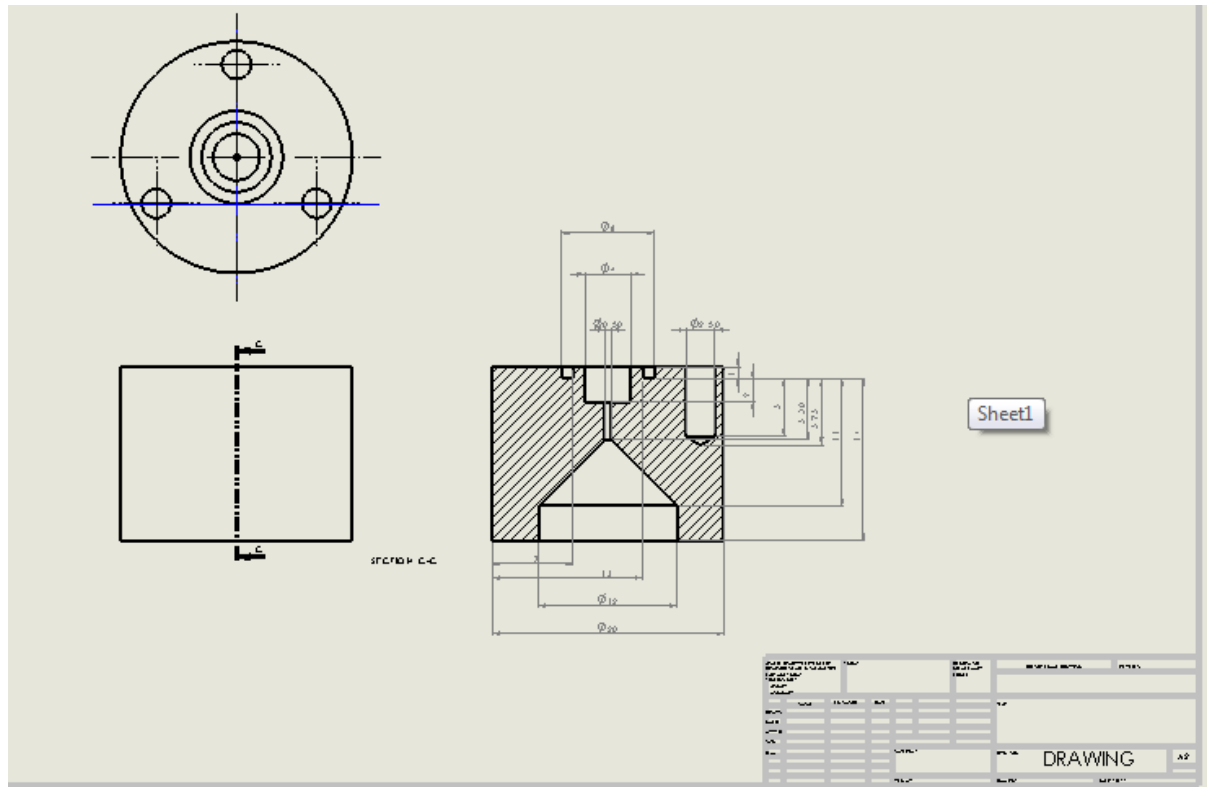
Έχοντας ολοκληρώσει με την κατασκευή της συσκευής το μόνο πείραμα που έχει δοκιμαστεί είναι το κατά πόσο υγρό μπορεί να απορροφηθεί από το ικρίωμα κολλαγόνου ώστε να διαπιστώσουμε πόσο εύκολο είναι να αλλάζουμε διαλύματα από τη στιγμή που το ικρίωμα έχει υγρανθεί. Έτσι βάζοντας το πορώδες ικρίωμα κολλαγόνου στη μήτρα τοποθετήσαμε ένα o-ring στον δακτύλιο για να κλείσει αεροστεγώς με το καπάκι. Στο κάτω καπάκι βάλαμε το στόμιο μιας πιπέτας για να μη χυθεί το υγρό και στη συνέχεια βάλαμε υγρό στο δοχείο χωρίς κύτταρα (εικόνα8). Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως το υγρό εμπαινε στη μήτρα και μέσα στο ικρίωμα. Όταν τοποθετούμε μία πιπέτα από την άλλη μεριά για να το τραβήξουμε αυτή απορροφούσε μικρή ποσότητα από το υγρό ή και καθόλου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή πίεση που ασκεί η πιπέτα, οπότε να χρειάζεται κάποια άλλη διάταξη περισσότερο κατάλληλη (π.χ. αντλία, συριγγα κ.τ.λ.) αλλά αυτό χρήζει μελλοντικής έρευνας.

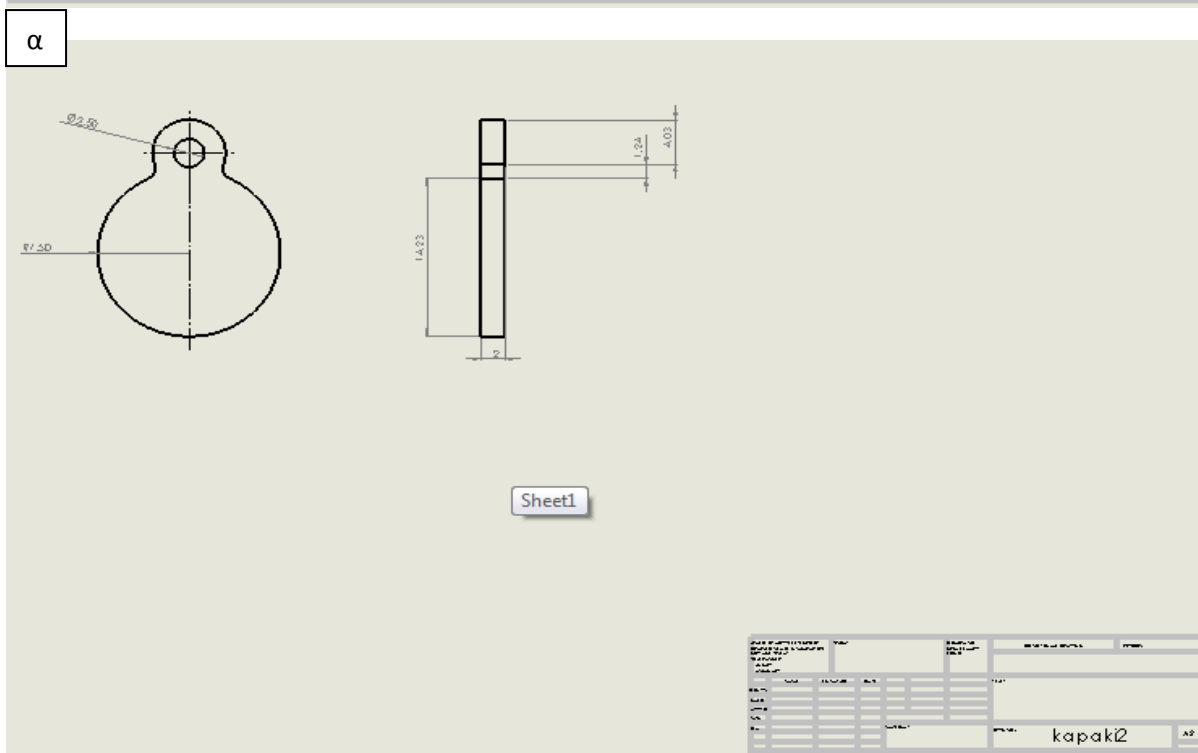
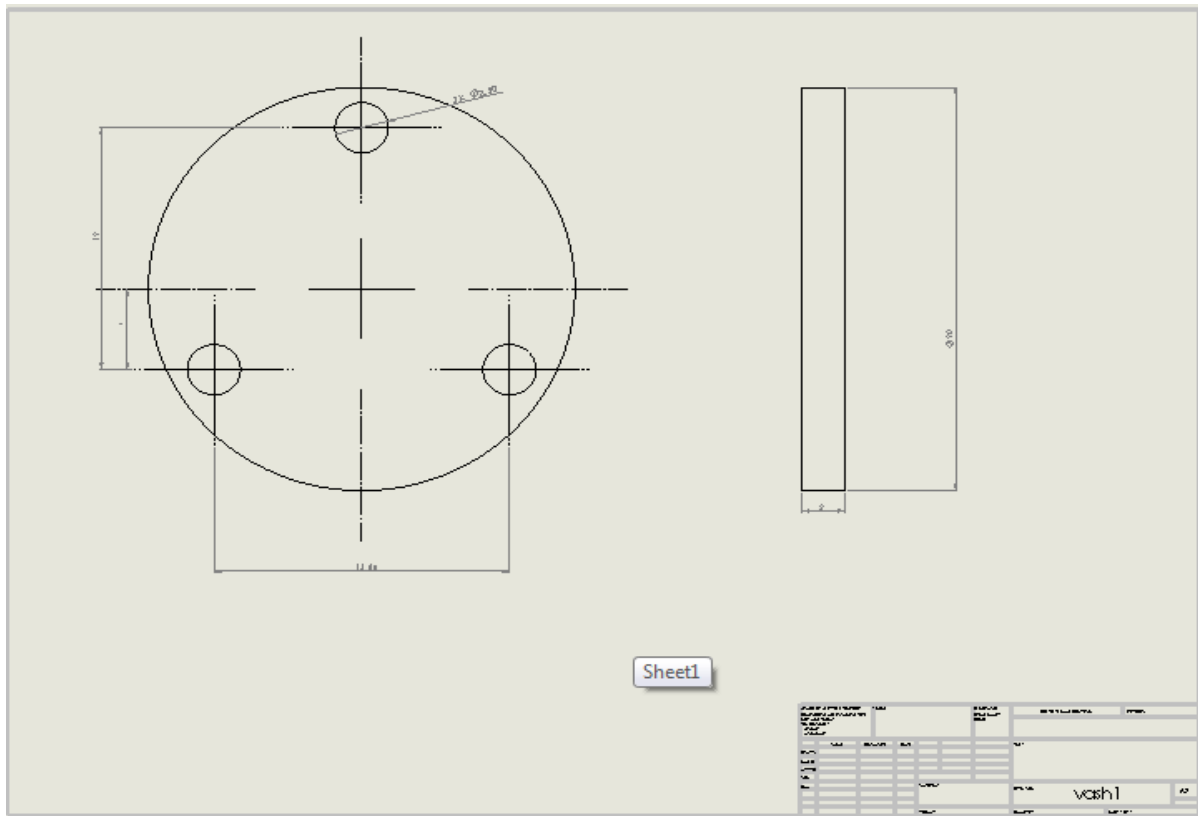
Με την ολοκλήρωση της κατασκευής αναμένεται να πραγματοποιηθούν πειράματα με διάφορους τύπους κυττάρων που θα στοχεύουν στη μελέτη:

- Του πως οι ιδιότητες της μήτρας επιδρούν στο φαινότυπο του κυττάρου
- Πως η παρουσία και οι ιδιότητες της μήτρας επιδρούν στη συμπεριφορά των κυττάρων σε διάφορα φάρμακα.



Εικόνα8.
Πρώτο
πείραμα
κατασκευής





β

Εικόνα9. α) κατασκευαστικό σχέδιο μήτρας, β) κατασκευαστικό σχέδιο για το κάτω και για το πάνω καπάκι

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [http://f3.tiera.ru/2/E_Engineering/EO_Optical%20devices/Schaaf%20P.%20\(ed.\)%20Laser%20Processing%20of%20Materials%20\(Springer,%202010\)\(ISBN%203642132804\)\(O\)\(241s\)_EO_.pdf](http://f3.tiera.ru/2/E_Engineering/EO_Optical%20devices/Schaaf%20P.%20(ed.)%20Laser%20Processing%20of%20Materials%20(Springer,%202010)(ISBN%203642132804)(O)(241s)_EO_.pdf)
- http://www.ll.mit.edu/publications/journal/pdf/vol10_no1/10_1photolithography.pdf
- <http://ocw.mit.edu/courses/electrical-engineering-and-computer-science/6-777j-design-and-fabrication-of-microelectromechanical-devices-spring-2007/lecture-notes/07lecture05.pdf>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2905156/>
- [Dimitrios Tzeranis: Fabrication of porous collagen scaffolds, Boston 2013](http://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/32876/62588716.pdf)
- <http://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/32876/62588716.pdf>
- <http://www.elveflow.com/microfluidic-reviews-and-tutorials/soft-lithography-for-microfluidics-and-life-sciences-an-introduction>
- <http://gmwgroup.harvard.edu/pubs/pdf/1073.pdf>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenotype>
- [**Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling**](#)
- James J. Tomasek, Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier & Robert A. Brown

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Fibroblast>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>